

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-90767

(43)公開日 平成6年(1994)4月5日

| | | | | |
|--------------------------|-------|---------|----------------|--------|
| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 1 2 N 15/55 | Z N A | | | |
| 1/21 | | 7236-4B | | |
| 9/42 | | 9161-4B | | |
| // (C 1 2 N 1/21 | | 8931-4B | C 1 2 N 15/ 00 | A |

審査請求 未請求 請求項の数3(全 7 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|----------|----------------|---------|-------------------------------------------------|
| (21)出願番号 | 特願平4-201836 | (71)出願人 | 591040719 野菜・茶業試験場長 三重県安芸郡安濃町大字草生360番地 |
| (22)出願日 | 平成4年(1992)7月7日 | (72)発明者 | 大山 暁男 三重県安芸郡安濃町大字草生360番地 農 林水産省 野菜・茶業試験場内 |
| | | (72)発明者 | 平井 正志 三重県安芸郡安濃町大字草生360番地 農 林水産省 野菜・茶業試験場内 |
| | | (72)発明者 | 西村 繁夫 三重県安芸郡安濃町大字草生360番地 農 林水産省 野菜・茶業試験場内 |
| | | (74)代理人 | 弁理士 久保田 藤郎 |

(54)【発明の名称】 トマト酸性インベルターゼ相補的遺伝子、該遺伝子を有する組換えベクター及び該組換えベクタ

(57)【要約】 ーを有する形質転換体

【構成】 配列表の配列番号1記載の塩基配列を有するトマト酸性インベルターゼをコードするcDNA、該cDNAを有する組換えベクター及び該組換えベクターを有する形質転換体。

【効果】 本発明により、トマト酸性インベルターゼをコードする相補的遺伝子と該遺伝子を有する組換えベクター及び該組換えベクターを有する形質転換体が提供される。この酸性インベルターゼ遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖を、例えば野性型トマト等に導入することにより、トマトなどの植物体中における当該酵素の活性を上昇あるいは抑制することができるようになり、糖含量を制御した新しい植物の育成等に大きく寄与することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1記載の塩基配列を有するトマト酸性インペルターゼをコードするcDNA。

【請求項2】 請求項1記載のcDNAを有する組換えベクター。

【請求項3】 請求項2記載の組換えベクターを有する形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、トマト酸性インペルターゼ相補的遺伝子(cDNA)、該遺伝子を有する組換えベクター及び該組換えベクターを有する形質転換体に関する。酸性インペルターゼ(β -フルクトシダーゼとも称する。)は、酸性側のpHの下、二糖類であるショ糖を単糖類であるブドウ糖と果糖に加水分解する酵素である。栽培種トマト果実中の糖類はブドウ糖と果糖が大部分であるが、この特異的な糖の蓄積は果実の成熟時に当該酵素の活性が飛躍的に増大することが主要因であるとみなされている。

【0002】この酵素遺伝子の発現を制御(例えばアンチセンスRNA等)し、ショ糖の蓄積量を増大させることが可能となれば、多様化する消費者の嗜好に対応した新しい風味をトマトに加えることができるようになる。

【0003】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】トマト果実中の酸性インペルターゼには種々のアイソザイムがあり、その精製も行われている(Plant Physiology, 95:1026-1035, 1991)。その中の一つに関しては、既にその遺伝子の構造が明らかにされている(Plant Physiology, 99:351-353, 1992)。しかしながら、他のアイソザイムについては未だ構造が解明されておらず、その酵素活性、機能なども全く不明である。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者は、トマト(Lycopersicon 属、例えばL. esculentum、品種：ハウスおどりこ)果実由来の酸性インペルターゼのアイソザイムの一つをコードする相補的遺伝子(cDNA、翻訳領域及び非翻訳領域を含む)の単離並びに構造の解明に成功し、本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は配列表の配列番号1記載の塩基配列を有するトマト酸性インペルターゼをコードするcDNA、該cDNAを有する組換えベクター並びに該組換えベクターを有する形質転換体に関する。

【0006】本発明の遺伝子は、配列表の配列番号1記載の塩基配列を有し、イニシエーターメチオニンを含む553個のアミノ酸に対応する構造遺伝子領域およびポリA鎖を含むその3'下流域の非翻訳領域からなる。

【0007】トマト果実より酸性インペルターゼに対応するmRNAを分離する際には、まずインタクトな総RNAを抽出することが望ましい。また、材料の果実とし

ては成熟した果実(Red ステージ)が望ましい。

【0008】トマト果実より総RNAを抽出する方法としては、例えば塩酸グアニジン/フェノール法などがある。調製した総RNAから酸性インペルターゼmRNAを得るには、オリゴdTセルロースカラムなどを用いることができる。この処理で直接酸性インペルターゼmRNAを単離することは容易でないで、得られたmRNA集団を鋳型としてcDNAを作製し、これらを有する微生物の集団(cDNAライブラリー)を作製することが望ましい。具体的には、GublerとHoffmanの方法(Gene, 25:263, 1983)等により2本鎖のcDNAを作製し、アダプターDNAを介してリガーゼにより適当なベクターに結合させ、宿主となる微生物を形質転換させ、cDNAライブラリーを作製する。次いで、このライブラリーから酸性インペルターゼmRNAに対応したcDNAクローンを同定する。

【0009】cDNAクローンを同定するには、酸性インペルターゼの部分アミノ酸配列の決定に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとするブランクハイブリダイゼーション法により選別すればよい。ここで用いるベクターとしては、大腸菌を宿主とする場合、pUC系や λ ファージ系のものが利用し易い。しかし、最も効率的に当該遺伝子を調製するには、トマト果実mRNAより作製されたcDNAをEcoRI 部位を有するアダプターDNAを介して λ gt10ファージベクターのEcoRI 部位にリガーゼにより結合せしめた後、ファージ粒子を形成させ、cDNAライブラリーを作製することにより行う。

【0010】このライブラリーからの酸性インペルターゼ遺伝子の検索は、上記オリゴヌクレオチドを³²Pで標識してプローブとすることにより行うことができる。このようにして得られた形質転換体をプレートライセート法等により大量培養して得られたファージ粒子より常法、例えばSambrookらの方法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)によりファージDNAを抽出し、さらにEcoRI 消化、アガロースゲル電気泳動を行うことにより、酸性インペルターゼに対応するcDNA断片を得ることができる。

【0011】この酸性インペルターゼcDNAの利用法としては、まず第一にこれを微生物、植物および動物のベクター等に組み込んで微生物、植物および動物で酸性インペルターゼ活性を増大させることを可能ならしめることである。さらに、別の利用法として、酸性インペルターゼcDNAを逆向きに挿入し、トマト等の植物細胞中で発現させ、本来植物が有する酸性インペルターゼ活性を抑制できることである。

【0012】ここで、微生物としてはエシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属等の細菌やサッカロミセス・セレビシエ等のサッカロミセス属等の酵母がある。また、植

物としては主としてアグロバクテリウム属細菌-Ri/Tiプラスミド系による形質転換が可能な双子葉植物、例えばトマト、タバコ、ジャガイモ等に代表されるナス科植物、メロン、キュウリ等のウリ科植物、洋種ナタネ等のアブラナ科植物、キウイ、柑橘類などの果樹類が挙げられる。その他、PEG-リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法（爆撃法）などによる形質転換が可能な植物としては、イネ、トウモロコシに代表されるイネ科植物等の単子葉植物がある。動物では、ヒト、マウス等の各種培養細胞（BALB/c-3T3等）が挙げられる。これら宿主に使用されるベクターを以下に例示する。

【0013】大腸菌のベクターとしては、文献（Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989、ベクターDNA、講談社、1986等）に記載の各種プラスミドベクター（pBR322, pUC系プラスミド等）およびファージベクター（ λ gt10, λ gt11, λ ZAP等）などがあり、酵母や動物細胞のベクターとしては、文献（Molecular Cloning: A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989、ベクターDNA、講談社、1986、遺伝子工学ハンドブック-実験医学別冊一、羊土社、1991等）に記載の各種ベクター類があげられる。植物ベクターとしては、通常クローニングに用いられるプラスミド由来の各種ベクターやコインテグレートベクター、パナリーベクター（pGA482, pGA580, pBI101, pBI121等）などのTiプラスミド由来のベクター類が挙げられる。ただし、Tiプラスミド由来の植物ベクターの場合は、得られた組換えDNAを一旦アグロバクテリウム・ツメファシエンシスLBA4404等に導入し、本組換え微生物を植物細胞にco-cultureすることなどにより感染させることによって、宿主植物に該cDNAを導入することができる。なお、植物においてこれらの組換えDNAを有する個体を育成するには、既知の組織培養法により器官あるいは個体を再生させればよい。

【0014】酸性インペルターゼcDNAのベクターへの組み込みは、通常試験管内で次のようにして行うことができる。酸性インペルターゼcDNAのDNA両端を必要に応じてエキソヌクレアーゼで処理し、それぞれに必要なDNAを接続し、あるいはアニーリング可能な組み合わせの塩基を複数個重合させる。しかる後、これを目的とするベクターに組み込む。ベクターに組み込む方法としては、ベクターを適当な制限酵素で切断し、必要により適当なリンカーまたはアニーリング可能な組み合わせの塩基を複数個重合させる。次いで、このように加工した二本鎖DNAとベクターDNAを混合し、リガーゼを用いて接続させる。得られた組換えDNAは、ベクターの宿主である微生物、植物細胞及び動物細胞に導入する。

【0015】

【実施例】次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例

Red ステージのトマト果実（*Lycopersicon esculentum*、品種：ハウスおどりこ）を液体窒素とブレンダーを用いて磨砕した後、塩酸グアニジン/フェノール法により総RNAを抽出した。このRNA 384 μ gをオリゴdTセルロースカラムにアプライし、溶出されたmRNAを常法に従ってエタノール沈澱させ、滅菌水に溶解した。次いで、得られたmRNA 2 μ gを鋳型としてGublerとHoffmanの方法（Gene, 25, 263, 1983）によりcDNAを合成した（Amersham cDNA synthesis system plus）。

【0016】合成された二本鎖cDNA 200 ngを常法に従ってフェノール処理、エタノール沈澱させた後、EcoRI アダプターを介してEcoRI 消化 λ gt10アーム1 μ gとライゲーション反応を行った。反応はT4 DNAリガーゼ（2.5 U）を用いて、15℃で14時間行った。次いで、ライゲーション混液を常法に従ってインビトロパッケージング（in vitro packaging）し、ファージ粒子を形成させ、常法に従って大腸菌NM514株に形質転換した。得られた形質転換株を培養して約45,000のプラークを得た（Amersham cDNA cloning system λ gt10）。

【0017】一方、酸性インペルターゼをトマト果実より精製し、そのN-末端のアミノ酸配列を決定した。この配列中でコドンの縮重の少ない領域について配列表の配列番号2記載のオリゴヌクレオチドを合成した。また、N-末端近傍に存在すると考えられているインペルターゼ共通アミノ酸配列（The Plant Cell, 2, 1107-1119, 1990）に基づくオリゴヌクレオチド（配列表の配列番号3記載のもの）を合成した。

【0018】上記2種のオリゴヌクレオチドをプライマーとして、トマト果実mRNAより合成した二本鎖cDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行った。その結果、約60 bpのcDNAが増幅され、これをT4 DNAポリメラーゼにより平滑末端にした後、プラスミドベクターpUC18のHincII部位に連結し、大腸菌JM109株を形質転換した。この形質転換株からアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出し、Sanger法による塩基配列解析を行ったところ、先に求めたトマト酸性インペルターゼN-末端のアミノ酸配列との比較で、10残基中8残基が一致したため、この断片は酸性インペルターゼcDNAの一部分であると考えられた。この断片の塩基配列データをもとに、配列表の配列番号4記載のオリゴヌクレオチド並びに配列表の配列番号5記載のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0019】上記2種をプローブとして λ gt10 cDNAライブラリーのプラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行ったところ、50個の陽性プラークを得た。このうち最も長いcDNAを含むクローン λ Ai

v-1 を選抜し、制限酵素EcoRI により c DNA断片を抜き出した後、構造解析用プラスミドpBluescript KS+のEcoRI 部位に挿入し、サブクローニングを行った。次いで、Steven Henikoffの方法(Gene, 28, 351, 1984)およびYanisch-Perronらの方法(Gene, 23, 103, 1985)に基づいてλAiv-1 由来のクローンAiv-1 の挿入部位を種々の程度に欠損するプラスミドを作製し、大腸菌でクローニングを行った。これらの一連の欠損プラスミドを用いて、Sanger法により酸性インベルターゼ c DNAの完全構造を明らかにした(配列表の配列番号1)。

【0020】その結果、トマトの酸性インベルターゼは、553個のアミノ酸からなる前駆体として合成され、N-末端の92個のアミノ酸が翻訳後取り除かれて461個のアミノ酸よりなる成熟蛋白として果実中で存在していることが、N-末端アミノ酸配列分析の結果からも明らかとなった。また、成熟蛋白に対応する部分には、インベルターゼ共通アミノ酸配列およびシステイン残基を基本とする活性中心の配列が見出され、本遺伝子は活性のあるインベルターゼ蛋白をコードするものと考えられる。

【0021】また、本遺伝子は先にデータベースに登録されたcDNAと高い相同性を有しているが、C末端のアミノ酸配列が83残基程短くなっており、かつ末端の12残基は既報のものとは全く異なるものであった。以上に述べたように、本発明のcDNAはトマト果実の酸性インベルターゼをコードするものであるが、先に報告されているcDNAとはそのC末端アミノ酸配列が異なるため、局在性等を異にするアイソザイムの一つであると考えられる。

【0022】

配列

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| ATG GCC ACT CAG TGT TAT GAC CCC GAA AAC TCC GCC TCT CGT TAC ACA | 48 |
| Met Ala Thr Gln Cys Tyr Asp Pro Glu Asn Ser Ala Ser Arg Tyr Thr | |
| -90 -85 -80 | |
| TTA CTC CCG GAT CAA CCC GAT TCC GGC CAC CGG AAG TCC CTT AAA ATC | 96 |
| Leu Leu Pro Asp Gln Pro Asp Ser Gly His Arg Lys Ser Leu Lys Ile | |
| -75 -70 -65 | |
| ATC TCC GGC ATT TTC CTC TCC GTT TTC CTT TTG CTT TCT GTA GCC TTC | 144 |
| Ile Ser Gly Ile Phe Leu Ser Val Phe Leu Leu Leu Ser Val Ala Phe | |
| -60 -55 -50 | |
| TTT CCG ATC CTC AAC AAC CAG TCA CCG GAC TTG CAA ATC GAC TCC CGT | 192 |
| Phe Pro Ile Leu Asn Asn Gln Ser Pro Asp Leu Gln Ile Asp Ser Arg | |
| -45 -40 -35 -30 | |
| TCG CCG GCG CCG CCG TCA AGA GGT GTT TCT CAG GGA GTC TCC GAT AAA | 240 |
| Ser Pro Ala Pro Pro Ser Arg Gly Val Ser Gln Gly Val Ser Asp Lys | |
| -25 -20 -15 | |
| ACT TTT CGA GAT GTA GCC GGT GCT AGT CAC GTT TCT TAT GCG TGG TCC | 288 |
| Thr Phe Arg Asp Val Ala Gly Ala Ser His Val Ser Tyr Ala Trp Ser | |
| -10 -5 1 | |
| AAT GCT ATG CTT AGC TGG CAA AGA ACG GCT TAC CAT TTT CAA CCT CAA | 336 |

【発明の効果】本発明により、トマト酸性インベルターゼをコードする相補的遺伝子と該遺伝子を有する組換えベクター及び該組換えベクターを有する形質転換体が提供される。この酸性インベルターゼ遺伝子のセンス鎖あるいはアンチセンス鎖を、例えば野性型トマト等に導入することにより、トマトなどの植物体中における当該酵素の活性を上昇あるいは抑制することができるようになり、糖含量を制御した新しい植物の育成等に大きく寄与することができる。

【0023】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2339

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：トマト(*Lycopersicon esculentum* Mill.)

株名：品種「ハウスおどりこ」

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1..1662

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：277..1659

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：insertion seq

存在位置：1623..1708

特徴を決定した方法：S

| | |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| Asn Ala Met Leu Ser Trp Gln Arg Thr Ala Tyr His Phe Gln Pro Gln | |
| 5 10 15 20 | |
| AAA AAT TGG ATG AAC GAT CCT AAT GGA CCA TTG TAT CAC AAG GGA TGG | 384 |
| Lys Asn Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Pro Leu Tyr His Lys Gly Trp | |
| 25 30 35 | |
| TAC CAC CTT TTT TAT CAA TAC AAT CCA GAT TCA GCT ATT TGG GGA AAT | 432 |
| Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Asp Ser Ala Ile Trp Gly Asn | |
| 40 45 50 | |
| ATC ACA TGG GGC CAT GCT GTA TCC AAG GAC TTG ATC CAC TGG CTC TAC | 480 |
| Ile Thr Trp Gly His Ala Val Ser Lys Asp Leu Ile His Trp Leu Tyr | |
| 55 60 65 | |
| TTG CCT TTT GCC ATG GTT CCT GAT CAA TGG TAT GAT ATT AAC GGT GTC | 528 |
| Leu Pro Phe Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Ile Asn Gly Val | |
| 70 75 80 | |
| TGG ACA GGG TCC GCT ACC ATC CTA CCC GAT GGT CAG ATC ATG ATG CTT | 576 |
| Trp Thr Gly Ser Ala Thr Ile Leu Pro Asp Gly Gln Ile Met Met Leu | |
| 85 90 95 100 | |
| TAT ACC GGT GAC ACT GAT GAT TAT GTG CAA GTG CAA AAT CTT GCG TAC | 624 |
| Tyr Thr Gly Asp Thr Asp Asp Tyr Val Gln Val Gln Asn Leu Ala Tyr | |
| 105 110 115 | |
| CCC GCC AAC TTA TCT GAT CCT CTC CTT CTA GAC TGG GTC AAG TTC AAA | 672 |
| Pro Ala Asn Leu Ser Asp Pro Leu Leu Leu Asp Trp Val Lys Phe Lys | |
| 120 125 130 | |
| GGC AAC CCG GTT CTG GTT CCT CCA CCC GGC ATT GGT GTC AAG GAC TTT | 720 |
| Gly Asn Pro Val Leu Val Pro Pro Pro Gly Ile Gly Val Lys Asp Phe | |
| 135 140 145 | |
| AGA GAC CCG ACT ACT GCT TGG ACC GGA CCA CAA AAT GGG CAA TGG CTG | 768 |
| Arg Asp Pro Thr Thr Ala Trp Thr Gly Pro Gln Asn Gly Gln Trp Leu | |
| 150 155 160 | |
| TTA ACA ATC GGG TCT AAG ATT GGT AAA ACG GGT GTT GCA CTT GTT TAT | 816 |
| Leu Thr Ile Gly Ser Lys Ile Gly Lys Thr Gly Val Ala Leu Val Tyr | |
| 165 170 175 180 | |
| GAA ACT TCC AAC TTC ACA AGC TTT AAG CTA TTG GAT GGA GTG CTG CAT | 864 |
| Glu Thr Ser Asn Phe Thr Ser Phe Lys Leu Leu Asp Gly Val Leu His | |
| 185 190 195 | |
| GCG GTT CCG GGT ACG GGT ATG TGG GAG TGT GTG GAC TTT TAC CCG GTA | 912 |
| Ala Val Pro Gly Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Phe Tyr Pro Val | |
| 200 205 210 | |
| TCT ACT AAA AAA ACA AAC GGG TTG GAC ACA TCA TAT AAC GGG CCG GGT | 960 |
| Ser Thr Lys Lys Thr Asn Gly Leu Asp Thr Ser Tyr Asn Gly Pro Gly | |
| 215 220 225 | |
| GTA AAG CAT GTG TTA AAA GCA AGT TTA GAT GAC AAT AAG CAA GAT CAT | 1008 |
| Val Lys His Val Leu Lys Ala Ser Leu Asp Asp Asn Lys Gln Asp His | |
| 230 235 240 | |
| TAT GCT ATT GGT ACG TAT GAC TTG GGA AAG AAC AAA TGG ACA CCC GAT | 1056 |
| Tyr Ala Ile Gly Thr Tyr Asp Leu Gly Lys Asn Lys Trp Thr Pro Asp | |
| 245 250 255 260 | |
| AAC CCG GAA TTG GAT TGT GGA ATT GGG TTG AGA CTA GAC TAT GGG AAA | 1104 |
| Asn Pro Glu Leu Asp Cys Gly Ile Gly Leu Arg Leu Asp Tyr Gly Lys | |

| | | | | |
|--------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| | 265 | 270 | 275 | |
| TAT TAT GCA TCA AAG ACT TTT TAT GAC CCG AAG AAA GAA CGA AGA GTA | | | | 1152 |
| Tyr Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Tyr Asp Pro Lys Lys Glu Arg Arg Val | | | | |
| | 280 | 285 | 290 | |
| CTG TGG GGA TGG ATT GGG GAA ACT GAC AGT GAA TCT GCT GAC CTG CAG | | | | 1200 |
| Leu Trp Gly Trp Ile Gly Glu Thr Asp Ser Glu Ser Ala Asp Leu Gln | | | | |
| | 295 | 300 | 305 | |
| AAG GGA TGG GCA TCT GTA CAG AGT ATT CCA AGG ACA GTG CTT TAC GAC | | | | 1248 |
| Lys Gly Trp Ala Ser Val Gln Ser Ile Pro Arg Thr Val Leu Tyr Asp | | | | |
| | 310 | 315 | 320 | |
| AAG AAG ACA GGG ACA CAT CTA CTT CAG TGG CCA GTG GAA GAA ATT GAA | | | | 1296 |
| Lys Lys Thr Gly Thr His Leu Leu Gln Trp Pro Val Glu Glu Ile Glu | | | | |
| | 325 | 330 | 335 | 340 |
| AGC TTA AGA GTG GGT GAT CCT ACT GTT AAG CAA GTC GAT CTT CAA CCA | | | | 1344 |
| Ser Leu Arg Val Gly Asp Pro Thr Val Lys Gln Val Asp Leu Gln Pro | | | | |
| | 345 | 350 | 355 | |
| GGC TCA ATT GAG CTA CTC CGT GTT GAC TCA GCT GCA GAG TTG GAT ATA | | | | 1392 |
| Gly Ser Ile Glu Leu Leu Arg Val Asp Ser Ala Ala Glu Leu Asp Ile | | | | |
| | 360 | 365 | 370 | |
| GAA GCC TCA TTT GAA GTG GAC AAA GTC GCG CTT CAG GGA ATA ATT GAA | | | | 1440 |
| Glu Ala Ser Phe Glu Val Asp Lys Val Ala Leu Gln Gly Ile Ile Glu | | | | |
| | 375 | 380 | 385 | |
| GCA GAT CAT GTA GGT TTC AGT TGC TCT ACT AGT GGA GGT GCT GCT AGC | | | | 1488 |
| Ala Asp His Val Gly Phe Ser Cys Ser Thr Ser Gly Gly Ala Ala Ser | | | | |
| | 390 | 395 | 400 | |
| AGA GGC ATT TTG GGA CCA TTT GGT GTC ATA GTA ATT GCT GAT CAA ACG | | | | 1536 |
| Arg Gly Ile Leu Gly Pro Phe Gly Val Ile Val Ile Ala Asp Gln Thr | | | | |
| | 405 | 410 | 415 | 420 |
| CTA TCT GAG CTA ACG CCA GTT TAC TTT TAC ATT TCT AAA GGA GCT GAT | | | | 1584 |
| Leu Ser Glu Leu Thr Pro Val Tyr Phe Tyr Ile Ser Lys Gly Ala Asp | | | | |
| | 425 | 430 | 435 | |
| GGT CGT GCA GAG ACT CAC TTC TGT GCT GAT CAA ACT AGG TTT GCT TTT | | | | 1632 |
| Gly Arg Ala Glu Thr His Phe Cys Ala Asp Gln Thr Arg Phe Ala Phe | | | | |
| | 440 | 445 | 450 | |
| CTA TCT GGC ACA ATT AAT TTG TCC TTG TAAATGGAG ATGGATAAAA | | | | 1679 |
| Leu Ser Gly Thr Ile Asn Leu Ser Leu | | | | |
| | 455 | 460 | | |
| GTAGGGGTT GTTGATCTGA TATATGCAGA TCCTCTGAGG CTCGGGGAGT TGGTAAACAA | | | | 1739 |
| GTTTATGGTA GTTCAGTACC TGTGTTGGAC GGTGAAAAAC ATTCAATGAG ATTATTGGTG | | | | 1799 |
| GATCACTCAA TTGTGGAGAG CTTTGCTCAA GGAGGAAGAA CAGTCATAAC ATCGCGAATT | | | | 1859 |
| TACCCAACAA AGGCAGTAAA TGGAGCAGCA CGACTCTTTG TTTTCAACAA TGCCACAGGG | | | | 1919 |
| GCTAGCGTTA CTGCCTCCGT CAAGATTGTTG TCACTTGAGT CAGCTAATAT TCAATCCTTC | | | | 1979 |
| OCTTTGCAAG ACTTGTAATC TTCTTTATTT CGTTTTTTTT TTCTTTTTC TTTGAAGGTT | | | | 2039 |
| ATTTACCCGA CGTCCCATCA AGAAAGGGAA GAGGGAGATC AATATATGTA GTGTTATTCC | | | | 2099 |
| CCCTACCTTA GGATTAGATG TCATCTAGCA ATGTCAAATC TAGTAGACTA TACAATGTAT | | | | 2159 |
| GGGTTCTTGG AAACCGAGTA GAGCTTACCT GGATTCTATG TAACTAAGA AAGCTCAGCA | | | | 2219 |
| AATATATGCA CAAATAATTT ACAGAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA | | | | 2279 |
| AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA | | | | 2339 |

【0024】配列番号：2

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCAATGGACTGCTTA 17

C G C C

A A

G G

【0025】配列番号：3

配列の長さ：14

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCATTAGGATCATT 14

G G G G

T

【0026】配列番号：4^C

配列の長さ：20

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCAAAAAAATTGGATGAACG 20

【0027】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGAAAATGGTAAGCCGTCCA 20

G

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/42

C 1 2 R 1:19)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.